

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

РОМАНЕНКО ЄВГЕН АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 615.451.1:582.635.5:543.632.233

**ФІТОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЕКСТРАКТІВ СОБАЧОЇ КРОПИВИ ДЛЯ
СТВОРЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

Харків – 2020

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
КОШОВИЙ ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ,
Національний фармацевтичний університет, МОЗ України,
завідувач кафедри фармакогнозії.

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, доцент
ОДИНЦОВА ВІРА МИКОЛАЇВНА,
Запорізький державний медичний університет, МОЗ України,
професор кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки;

доктор фармацевтичних наук,
ГУДЗЕНКО АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ,
ПВНЗ «Київський медичний університет»,
завідувач кафедри хімії.

Захист відбудеться «16» грудня 2020 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

Із дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розіслано «16» листопада 2020 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
професор

В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. В умовах сучасного ритму життя порушення діяльності ЦНС, пов'язані з надмірною збудливістю та підвищеною тривожністю, зустрічаються все частіше. Хронічний стрес та емоційні перенавантаження призводять до появи симптомів нейрогенних та психосоматичних захворювань. За статистикою ВООЗ (2017), на першому місці за поширеністю у світі є депресія, на яку страждає близько 300 млн. людей. В Україні на депресію страждає 6,3 % населення. Згідно з результатами сучасних досліджень, від 60 до 90 % візитів до лікаря пов'язані зі стресовими станами. Для медикаментозної корекції таких порушень здебільшого застосовують седативні та анксиолітичні засоби. Обираючи такі лікарські засоби, більш ніж 80 % населення віддають перевагу препаратам рослинного походження (WHO/MSD/MER/2017.2).

Трава собачої кропиви – одна з найбільш широко використовуваних видів лікарської рослинної сировини седативної дії. У літературних першоджерелах наведено значні наукові дані щодо дослідження хімічного складу представників роду *Leonurus* L. Загалом із цього роду було виділено та визначено структуру близько 270 речовин, представлені алкалоїдами, монотерпеноїдами, сесквітерпеноїдами, дитерпеноїдами, тритерпеноїдами, іридоїдами, флавоноїдами, фенілпропаноїдами, стероїдами та циклічними пептидами. Більшість науковців сконцентрували увагу на вивченні алкалоїдів (леонуруну та стахїдрину) і дитерпеноїдів (147 лабданових дитерпеноїдів), досліджуючи саме траву представників роду *Leonurus* L. (Zhang, 2018; Wojtyniak, 2013; Sayed, 2016).

На ринку України представлено 21 лікарський засіб, що містить у своєму складі БАР собачої кропиви трави. Одним із найпоширеніших є собачої кропиви настоянка. Для виготовлення настоянки як екстрагент застосовують спирт етиловий. Це обмежує контингент хворих, які можуть використовувати цей лікарський препарат (не рекомендовано для дітей, вагітних, годувальниць, осіб, діяльність яких потребує підвищеної уваги тощо). Під час використання настоянки для виготовлення твердих лікарських форм виникають питання з розпаданням, вивільненням та біодоступністю діючих речовин (Дмитрієвський, 2011).

Раніше в роботах професорів Дмитрієвського Д. І. та Комісаренка А. М. було обґрунтовано технологію одержання сухої настоянки собачої кропиви трави, яка полягає у заміні спирту на суху допоміжну речовину (сахароза, маніт, сорбіт тощо), що дозволяє отримати субстанцію з більш вигідними технологічними параметрами: задовільними сипкими властивостями, меншою гігроскопічністю та стійкістю під час зберігання. Модифікація галенових лікарських засобів амінокислотами сприяє поліпшенню технологічних параметрів субстанцій, збільшенню їх біодоступності та впливає на сумарний фармакологічний ефект (Zagaуко, 2018; Количев, 2016). У зв'язку з цим, розробка нових стандартизованих лікарських засобів на основі настоянки собачої кропиви трави, які б не містили етанол і відрізнялись

кращою біодоступністю, є актуальним завданням сучасної фармації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України як фрагмент комплексної наукової роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і задачі роботи. Метою роботи було фітохімічне вивчення модифікованих екстрактів собачої кропиви та вихідної сировини для створення нових лікарських засобів з психотропною, анксиолітичною та діуретичною активністю.

Для реалізації поставленої мети потрібно розв'язати такі завдання:

- провести огляд первинних джерел з ботанічної характеристики, ареалу поширення, ресурсних запасів України, вивчення хімічного складу й застосування в медицині рослин роду *Leonurus* L.;
- дослідити вплив основних груп БАР собачої кропиви настоянки (*Leonuri tinctura*) на її психотропну активність;
- розробити схеми одержання сухих модифікованих екстрактів з собачої кропиви трави;
- провести дослідження якісного складу та кількісного вмісту БАР у сухих модифікованих екстрактах собачої кропиви, настояці та вихідній сировині: траві, листі, квітках, стеблах;
- провести стандартизацію одержаних сухих модифікованих екстрактів та вихідної сировини;
- підтвердити ефективність та перспективність одержаних сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви трави шляхом вивчення їх психотропної, анкіолітичної та діуретичної активності.

Об'єкт дослідження. Комплексне фітохімічне вивчення ЛРС собачої кропиви та субстанцій на її основі для створення нових лікарських засобів з психотропною, анксиолітичною та діуретичною активністю.

Предмет дослідження. Виявлення, ідентифікація та кількісний вміст БАР у сухих модифікованих екстрактах собачої кропиви трави, настояці та вихідній сировині: траві, листі, квітках, стеблах; технологія створення та параметри стандартизації нових лікарських засобів з психотропною, анксиолітичною та діуретичною активністю.

Методи дослідження. В експериментальних дослідженнях використано такі методи: фізико-хімічні – ПХ (паперова хроматографія), ТШХ (тонкошарова хроматографія), ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія), ГХ-МС (газова хромато-мас-спектрометрія), спектрофотометрія в УФ- та видимій областях; хімічні – реакції ідентифікації, титриметричне та гравіметричне визначення кількісного вмісту БАР; дослідження біологічної активності проводили за допомогою методів *in vivo* (вивчення діуретичної та психотропної активності); статистичну обробку одержаних результатів досліджень здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Excel-7.0 (Microsoft Corp., США).

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведеного фітохімічного аналізу в настоянках собачої кропиви з трави, листя, квіток та стебел було ідентифіковано 6 речовин фенольної природи: 3 флавоноїди (рутин, апігенін, катехін), 3 гідроксикоричні кислоти (хлорогенова, розмаринова, кофейна кислоти), 4 іридоїдні сполуки (гарпагід, гарпагіду ацетат, аюгозид) та визначено їх кількісний вміст. З'ясовано, що квітки більшою мірою накопичують гідроксикоричні кислоти, основним компонентом яких є хлорогенова кислота, тоді як у листі в значній кількості накопичуються флавоноїди. У стеблах кількісний вміст всіх ідентифікованих речовин у декілька разів нижчий, ніж в інших частинах трави, тому їх вміст доцільно нормувати.

Під час вивчення динаміки екстрагування суми фенольних сполук, гідроксикоричних кислот та флавоноїдів з собачої кропиви трави проведено математичну обробку одержаних даних і визначено ефективний параметр кратності екстракції. Доведено, що оптимальна кратність спиртової екстракції БАР становить 2 рази, що дозволить більш ефективно використовувати природні, трудові та часові ресурси під час одержання настоянки та екстрактів.

Під час вивчення взаємозв'язків між вмістом основних груп БАР в екстрактах собачої кропиви трави виявлено, що найбільшу седативну активність мають субстанції, які містять іридоїди, що свідчить про доцільність додаткової стандартизації собачої кропиви трави, настоянки та екстрактів за вмістом саме цієї групи БАР.

У результаті вивчення сполук терпеноїдної природи рідкого екстракту собачої кропиви трави виявлено 73 летких сполуки, з яких ідентифіковано 35. Домінуючими сполуками серед речовин терпеноїдної природи є: борнілацетат, тимол, камфен, α -пінен, *n*-цимен, каріофілен, каріофіленоксид, тафітол.

Уперше розроблено способи одержання модифікованих сухих екстрактів з собачої кропиви настоянки з використанням амінокислот, які захищено патентами України на корисну модель 139940, 140278, 140280, 140688 та подано 3 заявки на патенти на винахід (а 2019 08252, а 2019 08149, а 2019 08223). Для одержання модифікованих екстрактів було використано 12 амінокислот: лізин, аспарагінова та глютамінова кислоти, лейцин, аланін, фенілаланін, гліцин, валін, гістидин, аргінін, цистеїн та метіонін.

Уперше в одержаних модифікованих сухих екстрактах виявлено 15 речовин фенольної природи, 8 з яких було ідентифіковано. В екстрактах виявлено 10 гідроксикоричних кислот, 3 з яких ідентифіковано (хлорогенова, кофейна та розмаринова кислоти). Серед флавоноїдів ідентифіковано катехін, гіперозид та рутин. В екстрактах спостерігався значний вміст елагової кислоти. Спектрофотометричним методом в одержаних сухих екстрактах уперше визначено кількісний вміст основних груп БАР: суми флавоноїдів, іридоїдів та поліфенолів.

Дослідження впливу сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви на поведінкові реакції в тестах «відкритого поля» та «піднесеного

хрестоподібного лабіринту» засвідчили, що найперспективнішими субстанціями є екстракти, модифіковані з лізином, гліцином, аланіном, валіном, фенілаланіном та аргініном. Після модифікації у цих субстанцій виявлено анксиолітичну активність. Крім того, екстракт з фенілаланіном додатково виявив виражену діуретичну активність, що є новим видом активності для засобів з собачої кропиви трави.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження взаємозв'язків між вмістом основних груп БАР та психотропною активністю екстрактів собачої кропиви трави довели, що доцільно під час стандартизації собачої кропиви трави, собачої кропиви настойки та її екстрактів проводити ідентифікацію, використовуючи ТШХ та кількісне визначення вмісту іридоїдів спектрофотометричним методом у перерахунку на гарпагіду ацетат. Вміст іридоїдів у собачої кропиви траві має бути не менше 0,4 %. Вміст іридоїдів у собачої кропиви настойці має бути не менше 0,04 %.

Розроблено схеми одержання найбільш перспективних сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви з використанням лізину, гліцину, аланіну, валіну, фенілаланіну та аргініну.

Уперше розроблено проекти МКЯ на сухі екстракти собачої кропиви, які були модифіковано з лізином, гліцином, аланіном, валіном, фенілаланіном та аргініном.

Розроблені схеми одержання сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви апробовано на обладнанні ТОВ «КФК «Грін фарм Косметик». Проекти технічних умов та проекти МКЯ на розроблені субстанції передано для подальшого впровадження у виробництво в компаніях ТОВ «КФК «Грін фарм Косметик» (м. Харків, Україна) та VgpharmexportSRL (м. Брюссель, Бельгія).

Результати досліджень упроваджено в навчальний процес та науково-дослідну роботу кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки, кафедри фармакогнозії, фармацевтичної хімії та технології ліків факультету післядипломної освіти Запорізького державного медичного університету; кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету; кафедри фармакогнозії Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною працею. Автором особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано та систематизовано літературні дані, проведено дослідження з вивчення якісного складу та кількісного вмісту БАР у об'єктах дослідження. Визначено основні показники якості сировини; розроблено проекти МКЯ на сировину та сухі екстракти. Розроблено схеми одержання з собачої кропиви настойки сухих модифікованих екстрактів. Проведено графічну та статистичну обробку одержаних результатів, написано всі розділи дисертаційної роботи. Постановку мети, завдань, узагальнення результатів, формулювання основних положень та висновків здійснено за участі наукового керівника.

Дослідження фармакологічних властивостей одержаних субстанцій проведено на базі ЦНДЛ НФаУ під керівництвом професора Кіреєва І. В. та доцента Трищук Н. М.

Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведено дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднено та обговорено на Українській науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю з дня народження доктора хімічних наук, професора Павла Олексійовича Петюніна (Харків, 2014); XXII Російському Національному конгресі «Людина і ліки» (Москва, 2015); IX Міжнародному симпозиумі «Фенольні сполуки: фундаментальні й прикладні аспекти» (Москва, 2015); VIII Національному з'їзді фармацевтів (Харків, 2016); XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2017); I Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині» (Харків, 2017); 9th International Pharmaceutical Conference «Science and practice 2018» (Kaunas, 2018); VII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2018); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку» (Харків, 2019); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження» (Івано-Франківськ, Яремче, 2020).

Публікації. За результатами дисертаційних досліджень опубліковано 21 наукову працю, зокрема 7 статей (5 статей у наукових фахових виданнях України, 2 статті в іноземних виданнях), 4 патенти України на корисну модель та 10 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, 5 розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 125 сторінок. Робота ілюстрована 21 рисунком та 19 таблицями. Список використаних джерел містить 156 найменування, з них – 90 латиною.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Собача кропива звичайна – джерело одержання БАР та лікарських препаратів (огляд літератури)

Проаналізовано дані наукових першоджерел щодо ботанічної характеристики, ареалів розповсюдження, заготівлі, сировинних запасів,

сучасного стану вивчення хімічного складу, фармакологічних властивостей препаратів собачої кропиви.

Хімічний склад представників роду *Leonurus* L. досить ретельно вивчено, але переважно досліджено траву цих рослин. У сировині рослин цього роду було виявлено алкалоїди, іридоїди, монотерпеноїди, сесквітерпеноїди, дитерпеноїди, тритерпеноїди, фенілпропаноїди, флавоноїди, стероїди та циклічні пептиди.

На фармацевтичному ринку України представлено 21 лікарський засіб на основі БАР собачої кропиви трави, 70 % з них – комплексні вітчизняні препарати. Ці препарати чинять заспокійливу дію на ЦНС. При цьому монопрепарати собачої кропиви трави представлено тільки настоякою, яка має ряд обмежень у застосуванні завдяки вмісту етанолу, тому доцільно створювати нові лікарські засоби на основі екстрактів собачої кропиви з новими технологічними властивостями, кращою біодоступністю та сумарним фармакологічним ефектом.

Відомості про прилади, реактиви, матеріали та методики

Наведено відомості про прилади, матеріали, методи і реактиви, які використовували під час проведення досліджень. Об'єктами досліджень були сухі модифіковані екстракти, настоянки промислового та екстемпорального виробництва, вихідна сировина – собачої кропиви трава, листя, квітки та стебла.

У розділі наведено методики визначення фенольних сполук (ТШХ, ВЕРХ, СФ), гідроксикоричних сполук (ТШХ, ВЕРХ, СФ); флавоноїдів (ТШХ, ВЕРХ, СФ), іридоїдів (ТШХ, СФ). Фармакологічні дослідження проводили *in vivo* з використанням стандартних методик.

Фітохімічне дослідження вихідної сировини та собачої кропиви настоянки

Проаналізовано 10 зразків собачої кропиви настоянки згідно з вимогами монографії ДФУ «Собачої кропиви настоянка^N».

Для визначення впливу співвідношення частин собачої кропиви трави (листя, квіток та стебел) на якість собачої кропиви настоянки спиртової настоянки (70 % етанол) одержували методом мацерації (співвідношення 1:5), враховуючи коефіцієнт поглинання екстрагента сировиною, згідно з фармакопейним методом. Якісний склад та кількісний вміст БАР у собачої кропиви настоянках з трави та її частин визначали методом тонкошарової хроматографії, спектрофотометричними методами та методом ВЕРХ (табл. 1 та 2). Вміст сухого залишку у настоянках трави, листя, квіток та стебел собачої кропиви склав $2,50 \pm 0,08$, $3,55 \pm 0,11$, $2,90 \pm 0,06$ та $1,07 \pm 0,04$ % відповідно.

Таблиця 1

Фенольні сполуки настоек собачої кропиви трави та її частин

№ з/п	Речовина	Вміст речовини у сухому залишку настойки, %			
		Трава	Листя	Квітки	Стебла
1.	Хлорогенова кислота	2,20±0,05	1,83±0,02	5,53±0,04	0,60±0,03
2.	Кофейна кислота	0,16±0,02	0,16±0,05	0,09±0,01	0,03±0,00
3.	Розмаринова кислота	0,05±0,01	0,02±0,00	0,07±0,01	0,01±0,00
4.	Рутин	1,19±0,03	1,69±0,05	1,27±0,06	0,79±0,04
5.	Апігенін	0,27±0,02	0,52±0,03	-	-
6.	Катехін	0,18±0,02	0,23±0,04	0,10±0,03	0,15±0,02

Примітка «-» – речовину не виявлено.

Таблиця 2

Вміст основних груп БАР у собачої кропиви настойках з надземних органів

Використаний метод	Кількісний вміст групи БАР у сухому залишку настойки, %			
	Трава	Листя	Квітки	Стебла
Сума фенольних сполук				
Спектрофотометрія ($\lambda = 270$ нм) в перерахунку на галову кислоту	13,56±0,03	14,28±0,04	12,63±0,05	5,41±0,01
Сума гідроксикоричних кислот				
Спектрофотометрія ($\lambda = 327$ нм) в перерахунку на хлорогенову кислоту	12,04±0,05	13,82±0,03	9,59±0,04	7,13±0,02
Сума флавоноїдів				
Спектрофотометрія ($\lambda = 417$ нм) в перерахунку на рутин	1,63±0,03	3,06±0,03	1,91±0,04	0,60±0,02
Спектрофотометрія ($\lambda = 425$ нм) в перерахунку на гіперозид	0,92±0,02	1,73±0,03	1,07±0,02	0,34±0,02

З'ясовано, що квітки більшою мірою накопичують гідроксикоричні кислоти, основним компонентом яких є хлорогенова кислота, тоді як у листі в значній кількості накопичуються флавоноїди. У листі було ідентифіковано апігенін у більшій кількості, ніж у траві, а у квітках та стеблах він відсутній.

У стеблах вміст всіх ідентифікованих речовин у декілька разів нижчий, ніж в інших частинах трави, тому їх вміст в сировині доцільно нормувати.

Дослідження довели, що найбільший внесок у вміст флавоноїдів у настійці собачої кропиви з трави має саме листя, у квітках їх на третину менше, тоді як у стеблах виявлено їх незначну кількість. З огляду на сказане, під час заготовляння сировини необхідно вилучати грубі, здерев'янілі стебла, які значно знижують вміст діючих речовин та впливають на якість сировини і галенових засобів на її основі.

Досліджуючи динаміку екстракції БАР з собачої кропиви трави 70 % етанолом, проводили 4-х кратну екстракцію новими порціями екстрагента. Одержані витяжки на кожній стадії та собачої кропиви настійку досліджували методом ВЕРХ. У результаті аналізу в одержаних витяжках було ідентифіковано 5 речовин: 2 флавоноїди і 3 гідроксикоричні кислоти, а також визначено їх кількісний вміст.

В одержаних витяжках з собачої кропиви трави визначено вміст основних груп БАР спектрофотометричним методом (табл. 3). Вміст сухого залишку у витяжках собачої кропиви трави 1, 2, 3 та 4 склав $2,07 \pm 0,07$, $0,81 \pm 0,06$, $0,38 \pm 0,04$ та $0,19 \pm 0,03$ % відповідно.

Таблиця 3

Вміст основних груп БАР у витяжках з собачої кропиви трави

Група БАР	Кількісний вміст у сухому залишку, %				
	Настійка	Витяжка 1	Витяжка 2	Витяжка 3	Витяжка 4
Сума фенольних сполук	$14,64 \pm 0,02$	$15,22 \pm 0,03$	$10,7 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,05$	$6,1 \pm 0,02$
Сума гідроксикоричних кислот	$12,6 \pm 0,05$	$11,3 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,02$	$7 \pm 0,01$	$5,5 \pm 0,03$
Сума флавоноїдів	$1,1 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,07$	$0,82 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,01$

З огляду на ці результати як критерії оптимізації було обрано вміст: сухого залишку, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та суми фенольних сполук. Враховували рівняння залежності визначених кількісних показників від кратності екстракції. Для оптимізації екстрагування БАР і вибору оптимальної кратності екстракції було розраховано коефіцієнт масовіддачі кожної стадії ($m_{\text{екстракту}}/m_{\text{спирту}}$) за кожним з показників та за допомогою пакета прикладних програм «STATISTIKA» виведено залежність цих факторів від кратності екстракції. З'ясовано, що оптимальна кратність спиртової екстракції БАР у процесі одержання собачої кропиви настійки

становить 2 рази, тоді як на виробництві використовують однократну мацерацію у співвідношенні 1:5. Тому доцільно під час виробництва собачої кропиви настойки проводити двократну екстракцію, що дозволить раціональніше використовувати природні, трудові та часові ресурси.

Для дослідження впливу груп БАР собачої кропиви настойки на психотропну активність з настойки було одержано сухі екстракти відповідно до схеми, наведеної на рис. 1. Для видалення з настойки фенольних сполук використано колонку з оксидом алюмінію, з післяколонкової рідини одержано екстракт 2. Для видалення з настойки алкалоїдів та амінокислот використано колонку з катіонітом КУ2, з післяколонкової рідини одержано екстракт 3. Дози діючих речовин в одержаних екстрактах 1, 2 і 3 еквівалентні первинній собачої кропиви настойці.

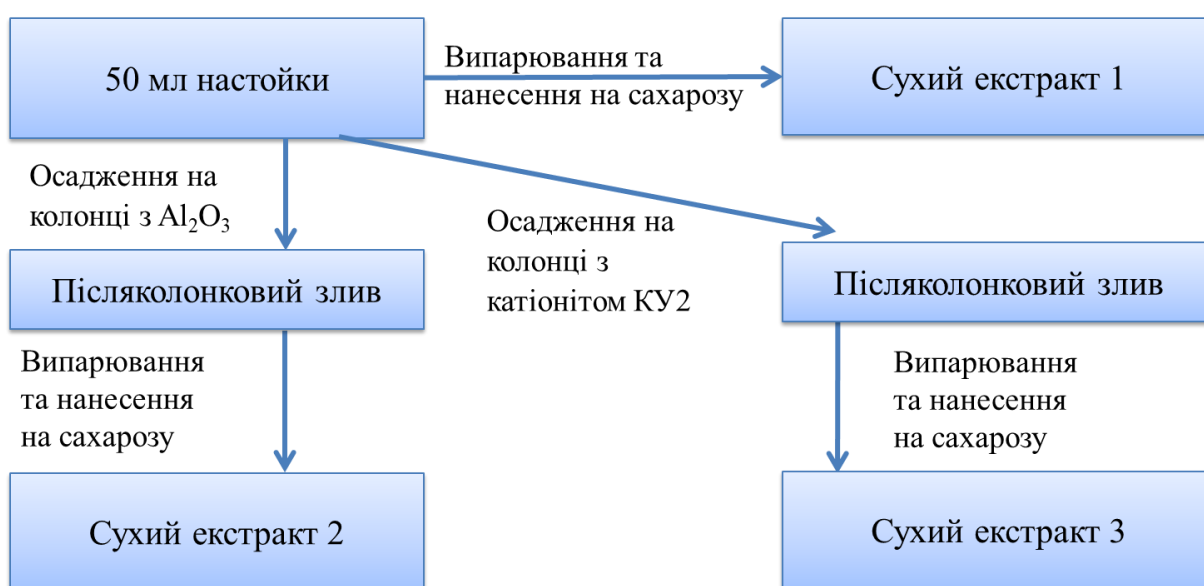


Рис. 1. Схема концентрування основних груп БАР собачої кропиви настойки

У результаті ТШХ одержаних сухих екстрактів було ідентифіковано такі групи БАР: флавоноїди (рутин), сума гідроксикоричних кислот (хлорогенова і кофейна кислоти) та іридоїди. Кількісне визначення суми гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, фенольних сполук та іридоїдів проводили спектрофотометричним методом.

Психотропну активність одержаних сухих екстрактів вивчали у ЦНДЛ НФаУ під керівництвом професора Кіреєва І. В. та доцента Трищук Н. М. у тесті «відкритого поля» (ВП) на білих щурах. Найбільшу седативну та стреспротекторну активність проявили екстракти 1 та 2, тоді як екстракт 3 майже не змінив вегетативний супровід емоційних реакцій. Враховуючи хімічний склад досліджуваних екстрактів, довели, що саме іридоїдні сполуки мають найбільший вплив на седативну та стреспротекторну активність субстанцій на основі собачої кропиви трави, а фенольні сполуки, які

здебільшого були сконцентровані в екстракті 3, майже не впливали на показники, які визначали. Отже, під час стандартизації собачої кропиви настойки та її препаратів доцільно додатково контролювати вміст іридоїдів, що забезпечить стабільність фармакодинаміки лікарських засобів.

Фітохімічний профіль та фармакологічна активність сухих модифікованих екстрактів на основі настойки собачої кропиви (*Leonurus cardiaca*L.)

Для визначення впливу технологічних факторів на хімічний склад кінцевого сухого екстракту собачої кропиви трави проведено фітохімічне вивчення рідкого та сухого екстрактів з цієї сировини (табл. 4 та рис. 2).

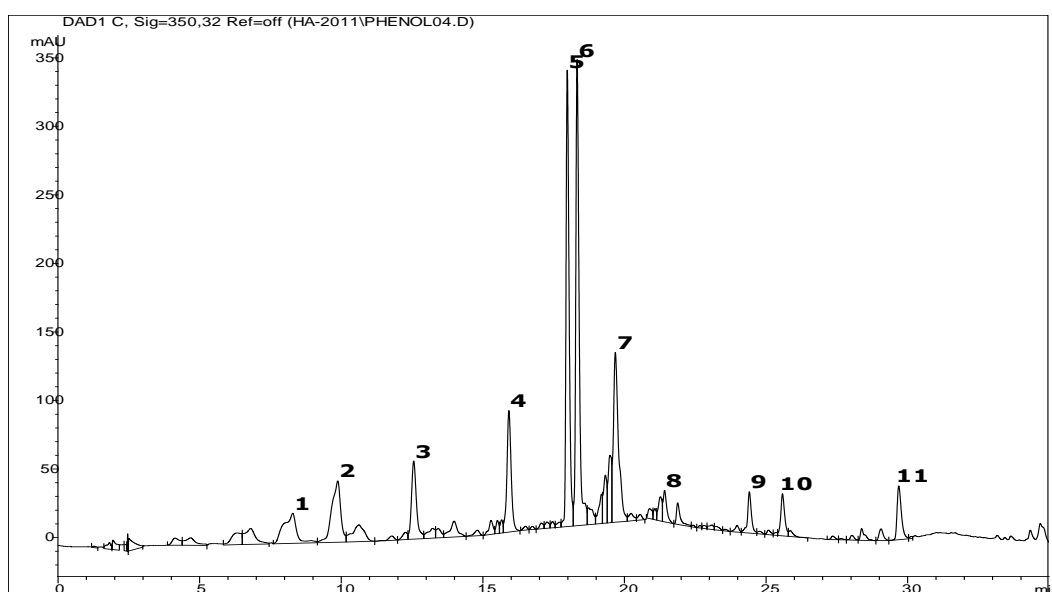


Рис. 2. Типова хроматограма фенольних сполук сухого екстракту собачої кропиви трави

З таблиці видно, що під час технологічного процесу склад фенольних сполук екстрактів суттєво не змінюється, тоді як терпенові сполуки, які містяться в незначній кількості, майже повністю випаровуються.

З похідних гідроксикоричних кислот виявлено 5 сполук, з яких ідентифіковано 2: хлорогенова і кофейна кислоти. З флавоноїдів виявлено 3 сполуки, зокрема рутин, апігенін та гіперозид.

Загальний кількісний вміст гідроксикоричних кислот у рідкому екстракті 376,5 мг/л: вміст кофейної кислоти становить 23,6 мг/л, хлорогенової – 36,9 мг/л. Найбільшу концентрацію серед флавоноїдів мають: рутин, вміст якого становить 219,8 мг/л екстракту, або 69,00 % від вмісту всіх флавоноїдів досліджуваного екстракту; апігенін, кількісний вміст якого становить 55,9 мг/л екстракту, або 17,56 % від загальної кількості флавоноїдів.

Хімічний склад фенольних сполук рідкого та сухого екстрактів собачої кропиви трави

№ з/п	Речовина	Вміст речовин у екстракті	
		Рідкий екстракт, в мг/л	Сухий екстракт, в г/кг
1	Кофейна кислота	23,6	1,34
2	Похідна кофейної кислоти-1	98,3	5,28
3	Хлорогенова кислота	36,9	2,1
4	Похідна кофейної кислоти-2	81,9	4,68
5	Похідна кофейної кислоти-3	135,8	7,92
6	Неідентифікована речовина-1	19,69	1,29
7	Рутин	219,8	13,04
8	Неідентифікована речовина-2	16,1	0,95
9	Гіперозид	42,7	2,14
10	Апігенін	55,9	2,96

У результаті проведених досліджень фенольного складу сухого екстракту трави кропиви собачої методом ВЕРХ виявлено 10 сполук фенольної природи.

Загальний кількісний вміст гідроксикоричних кислот у сухому екстракті – 21,32 г/кг: вміст кофейної кислоти становить 1,34 г/кг, хлорогенової 2,1 г/кг. Найбільшу концентрацію серед флавоноїдів мають: рутин, вміст якого становить 13,04 г/кг екстракту, або 71,89 % від вмісту всіх флавоноїдів досліджуваного екстракту; апігенін, кількісний вміст якого становить 2,96 г/кг екстракту, або 16,31 % від загальної кількості флавоноїдів.

Вивчення сполук терпеноїдної природи проводили методом хромато-мас-спектрометрії на газовому хроматографі Agilent 6890, який оснащений мас-спектрометричним детектором 5973 (МС) (рис. 3).

У результаті проведених досліджень терпеноїдного складу рідкого екстракту собачої кропиви в досліджуваному об'єкті виявлено 73 леткі сполуки, з яких ідентифіковано 35: моноциклічні і біциклічні монотерпеноїди, сесквітерпеноїди тощо, з них 13 монотерпеноїдів (1,8-цинеол, терпінен-4-ол, γ -терпінен, α -пінен, камфен, камфора, вербенол, борнеол і борнілацетат, *n*-цимен, тимол, метилтимол, метилкарвакрол), 10 сесквітерпеноїдів (фарнезол, гумулен і його оксид, каріофілен і його оксид, γ -кадинен, аромадендрен, спатуленол, валереналь, сейшелен), дитерпеновий спирт фітол, коротколанцюгові вуглеводні й аліфатичні спирти (2-метил-1,1-діетокси-бутан, 2-метил-1,1-діетокси-пропан, 1-октен-3-ол), аліфатичні довголанцюгові кислоти та їх ефіри (тетрадекановата і ліолева кислоти,

етилпальмітат, етилстеарат), фітостероли (кемпестерол, стигмастерол, γ -ситостерол). Загальний кількісний вміст леткої фракції становить 798,25 мг/л, зокрема: монотерпеноїди – 57,9 мг/л, сесквітерпеноїди – 34,8 мг/л, дитерпеноїди – 27,2 мг/л, коротколанцюгові вуглеводні й аліфатичні спирти – 7,7 мг/л, аліфатичні довголанцюгові кислоти та їх естери – 85 мг/л, фітостероли – 63,9 мг/л, сполуки класу фенолів – 4 мг/л.

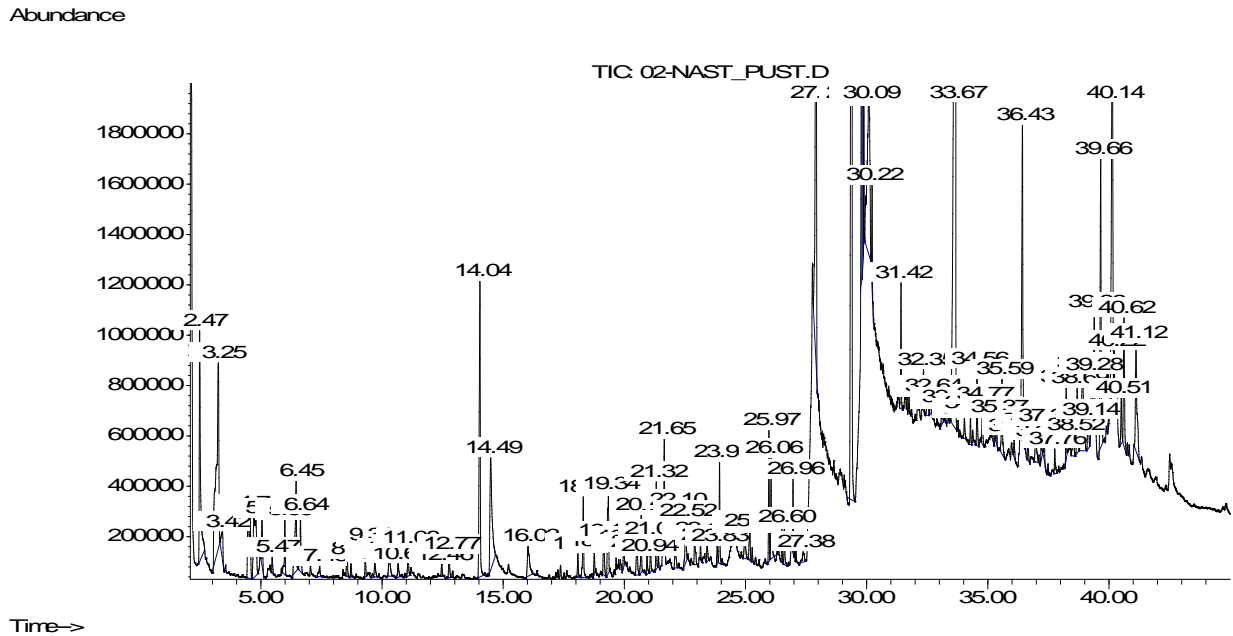


Рис. 3. Типова хроматограма терпенових сполук рідкого екстракту собачої кропиви трави

Домінувальними сполуками серед речовин терпеноїдної природи є: фітол, борнілацетат, тимол, камфен, α -пінен, *n*-цимен, каріофілен, каріофіленоксид, загальний вміст яких становить 81 мг/л. Дослідження терпенових сполук сухого екстракту собачої кропиви засвідчило, що під час сушіння значна їх частина випаровується.

Для одержання модифікованих сухих екстрактів собачої кропиви використовували 12 амінокислот: лізин, аспарагінова та глютамінова кислоти, лейцин, аланін, фенілаланін, гліцин, валін, гістидін, аргінін, цистеїн та метіонін (рис. 4). Розроблені способи одержання сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви захищено патентами України 139940, 140278, 140280, 140688 та 3 заявками на патенти на винахід (а 2019 08252, а 2019 08149, а 2019 08223).

Одержані екстракти проаналізовано методом ВЕРХ (табл. 5).



Рис. 4. Схема одержання модифікованих екстрактів собачої кропиви

Таблиця 5

Результати ВЕРХ модифікованих екстрактів собачої кропиви

Речовина	Кількісний вміст у екстракті, мг/кг												
	Екстракт з настойки собачої кропиви (ЕСК)	з лізином	з аспарагіновою к-тою	з лейцином	з аланіном	з фенілаланіном	з гліцином	з валіном	з гістидином	з глютаміновою к-тою	з аргініном	з цистеїном	з метіоніном
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Похідна кофейної к-ти 1	17,9	23,7	18,6	17,2	18,9	21,7	19,3	24,7	25,2	16,7	18,4	17,3	16,1
Похідна кофейної к-ти 2	23,6	21,7	26,3	19,4	25,2	28,5	23,5	21,8	26,9	20,2	24,7	23,8	21,3
Хлорогенова кислота	768,7	658,8	713,8	787,9	763,8	697,4	756,9	798,4	752,7	801,6	761,9	759,7	748,4
Кофейна кислота	55,8	50,8	61,5	62,4	56,9	51,8	58,2	59,3	55,7	49,8	52,9	51,4	53,7
Похідна кофейної к-ти 3	36,8	33,9	37,8	36,6	33,2	37,9	30,8	32,6	36,8	35,8	29,7	31,6	30,5
Похідна кофейної к-ти 4	14,4	11,8	13,7	12,9	8,9	13,2	15,8	11,9	16,4	11,6	13,2	15,7	7,5
Похідна кофейної к-ти 5	12,7	9,8	10,4	8,7	0	12,1	9,5	9,3	11,3	12,3	11,7	0	8,7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Рутин	12,0	10,7	11,6	12,7	13,1	9,8	11,7	12,6	11,7	12,4	11,8	9,5	10,1
Елагова кислота	416,5	408,7	379,3	401,0	376,9	423,8	413,1	408,7	421,6	391,7	403,8	402,9	397,9
Гіперозид	21,0	22,8	18,7	20,4	21,8	19,8	20,9	21,8	23,9	21,8	20,8	21,2	20,7
Розмаринова кислота	17,2	15,4	16,8	20,1	22,1	18,1	17,5	16,1	15,8	15,2	14,8	16,3	15,4
Похідна кофейної к-ти 6	9,7	8,6	0	5,9	4,3	0	7,6	8,6	7,0	9,2	0	5,8	4,3
Похідна кофейної к-ти 7	4,7	4,1	0	0	3,9	0	3,5	0	3,7	4,8	0	0	5,1
Катехін	62,5	57,3	63,8	60,2	58,7	59,2	60,1	62,4	65,2	60,8	59,2	58,6	61,7
Метоксі-апигенін	39,5	34,8	33,5	40,1	37,5	40,6	38,6	33,9	35,2	36,8	41,2	38,6	37,3

Результати досліджень екстрактів собачої кропиви засвідчили, що вони мають схожий компонентний склад фенольних сполук. В екстрактах було виявлено 15 основних речовин фенольної природи, 8 з яких було ідентифіковано. В екстрактах виявлено 10 гідроксикоричних кислот, 3 з яких ідентифіковано (хлорогенова, кофейна та розмаринова кислоти). Домінують гідроксикоричними кислотами були хлорогенова та кофейна. Серед флавоноїдів було ідентифіковано катехін, гіперозид та рутин. Варто зауважити, що в екстрактах спостерігається значний вміст елагової кислоти.

Крім того, в екстрактах спектрофотометричним методом було визначено кількісний вміст суми флавоноїдів, іридоїдів та поліфенолів (рис.5, 6).

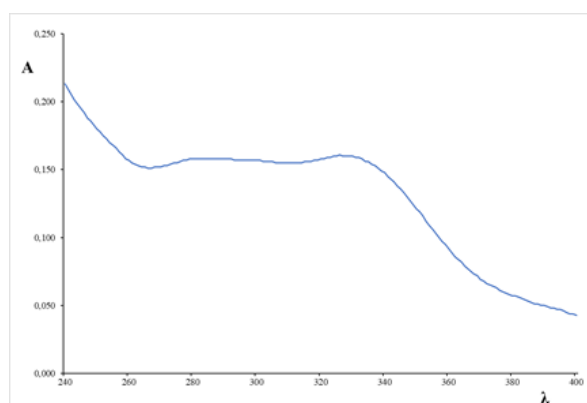


Рис. 5. Типовий УФ-спектр сухого екстракту собачої кропиви трави

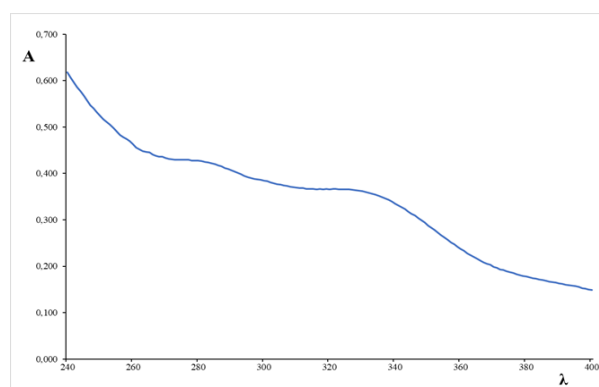


Рис 6. Типовий УФ-спектр сухого екстракту собачої кропиви трави, модифікованого фенілаланіном

Вміст основних груп БАР в одержаних екстрактах суттєво не відрізнявся, оскільки вихідну сировину – собачої кропиви настойку брали в однакових кількостях. Виходячи з результатів фітохімічного аналізу екстрактів, з'ясували, що склад фенольних сполук суттєво не відрізнявся, а

основні відмінності екстрактів пов'язані з вмістом амінокислот, які, напевно, мають вплив на загальний фармакологічний ефект.

Дослідження впливу модифікованих екстрактів собачої кропиви на поведінкові реакції лабораторних щурів у тесті «відкритого поля» (рис. 7) та тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт» (рис. 8) проведено під керівництвом професора Кіреєва І. В. та доцента Трищук Н. М. на базі ЦНДЛ НФаУ.

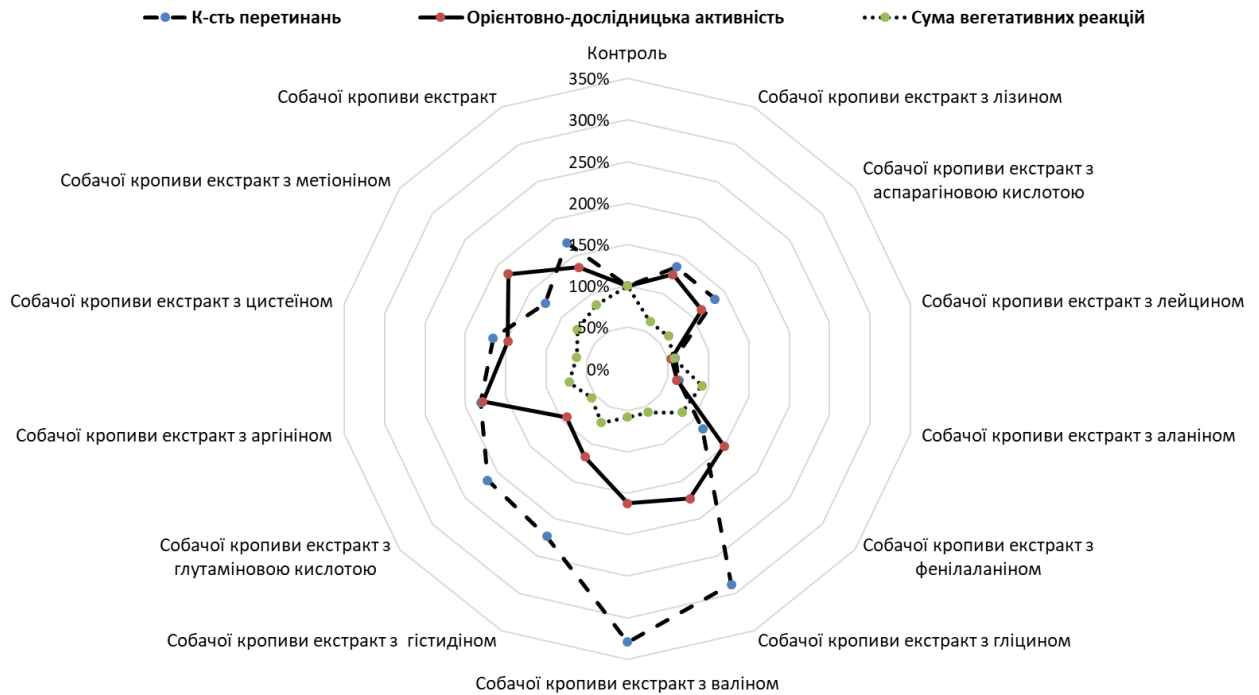


Рис. 7. Результати розподілу видів активності екстрактів собачої кропиви на поведінкові реакції лабораторних щурів у тесті «відкритого поля»

Аналізуючи отриманні результати, зауважимо, що найактивнішими виявилися екстракти собачої кропиви в комплексах з валіном, гліцином, аргініном та цистеїном, які спричиняли збільшення рухової та орієнтовно-дослідницької активності дослідних щурів, при цьому зменшуючи показники емоційного стану тварин.

Здатність фармакологічних засобів знижувати час перебування гризунів у темних компартментах більше, ніж на 50 %, а також підвищувати час перебування в освітлених у 2-4 рази можна розцінювати як ефект, притаманний для істинних анксиолітиків. Отримані результати вказують на наявність анксиолітичної активності в досліджуваних екстрактів собачої кропиви в комплексі з амінокислотами. Найефективніше зменшували тривожність тварин екстракти з лізином, гліцином, валіном та аргініном. Перевагами досліджуваних екстрактів є відсутність дії на тонус м'язів та координацію рухів. Екстракти собачої кропиви в комплексі з аланіном та лейцином проявляли виражену седативну дію.

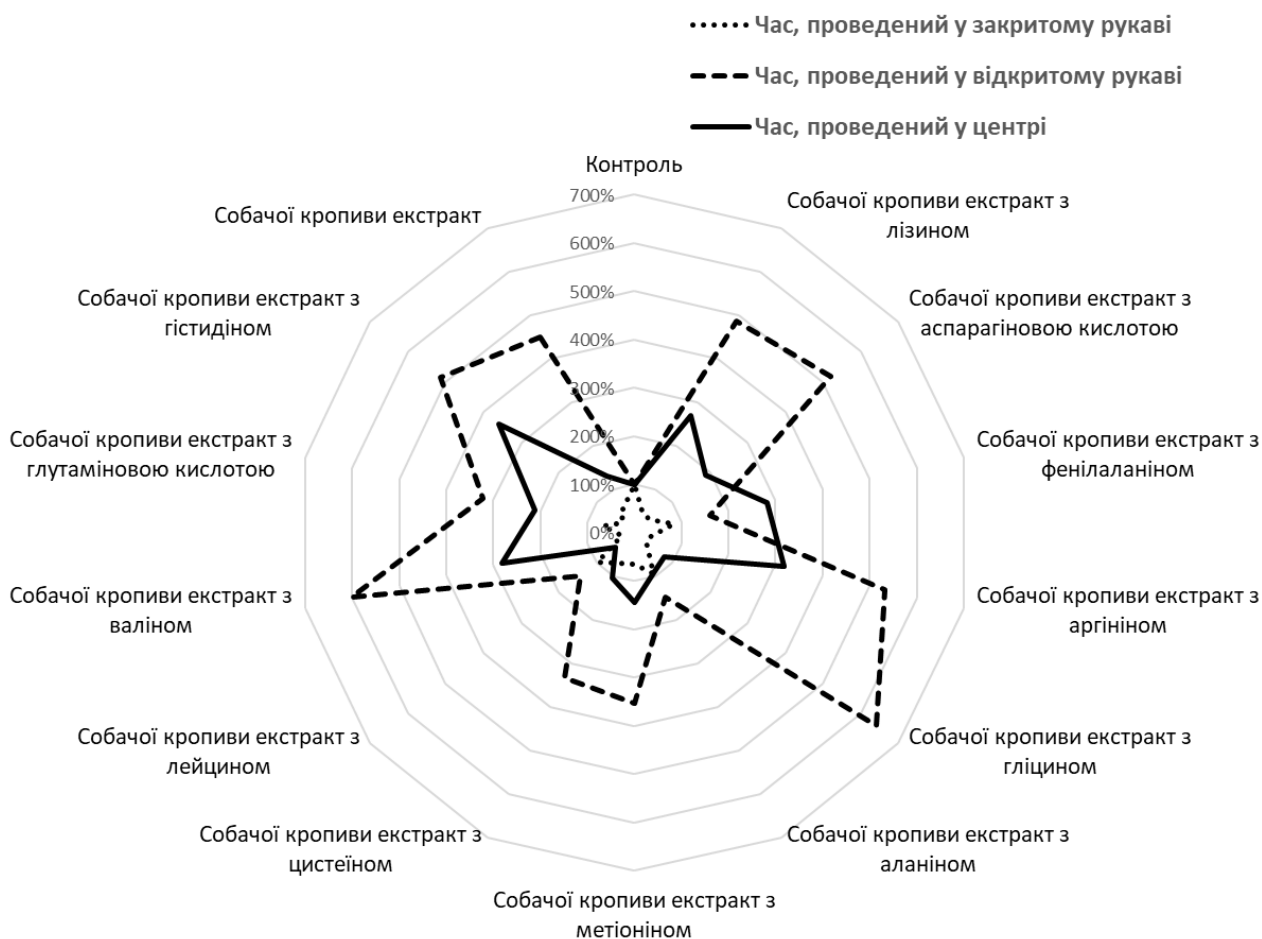


Рис. 8. Результати розподілу видів активності екстрактів собачої кропиви в тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт»

Екстракти собачої кропиви з лейцином, аланіном та фенілаланіном зумовлювали достовірне збільшення об'єму сечі щурів. Так, на їх фоні виділюваний об'єм сечі статистично значущо зростає на 39,8 %, 129,0 % та 51,6 % відповідно, порівняно з показником тварин групи інтактного контролю ($p \leq 0,05$). Отримані результати можуть свідчити про наявність у цих екстрактів діуретичної активності, що виявлено вперше для цієї сировини.

Стандартизація лікарської рослинної сировини та екстрактів собачої кропиви

Запропоновано під час стандартизації собачої кропиви трави та настойки додатково проводити кількісне визначення вмісту іридоїдів спектрофотометричним методом у перерахунку на гарпагіду ацетат. Вміст іридоїдів у собачої кропиви траві повинен бути не менше 0,4 %. Вміст іридоїдів у собачої кропиви настійці повинен бути не менше 0,04 %.

Розроблено проекти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви, які були

модифіковані з лізином, гліцином, аланіном, валіном, фенілаланіном та аргініном. Проекти МКЯ на сухі екстракти собачої кропиви розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (флавоноїди), В (іридоїди) та С (амінокислоти)), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на гіперозид) та іридоїдів (не менше 0,4 % у перерахунку на гарпагіду ацетат). Усі екстракти відповідали вимогам розробленої документації. Розроблені проекти МКЯ на сухі модифіковані екстракти відтворюються в лабораторних умовах ТОВ «КФК» Грін фарм Косметик» (м. Харків, Україна) та BrupharmexportSRL (м. Брюссель, Бельгія), про що свідчать акти впровадження.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено експериментальне вирішення наукових завдань, які реалізуються у фітохімічному вивченні модифікованих сухих екстрактів собачої кропиви звичайної та вихідної сировини (трави та настойки) для створення нових потенційних стандартизованих лікарських засобів з психотропною, анксиолітичною та діуретичною активністю.

1. У результаті фітохімічного аналізу БАР методом ВЕРХ собачої кропиви настоек з трави, листя, квіток та стебел було ідентифіковано 6 речовин: 3 флавоноїди (рутин, апігенін та катехін), 3 гідроксикоричні кислоти (хлорогенова, розмаринова, кофейна), а також визначено їх кількісний вміст. Доведено, що квітки більшою мірою накопичують гідроксикоричні кислоти, основним компонентом яких є хлорогенова кислота, тоді як у листі в значній кількості накопичуються флавоноїди. Під час вивчення динаміки екстрагування фенольних сполук з собачої кропиви трави на основі математичної обробки одержаних даних визначено ефективний параметр кратності екстракції (2 рази).

2. Доведено, що найбільшу седативну активність виявляють субстанції, які містять значну кількість іридоїдів, що свідчить про доцільність додаткової стандартизації собачої кропиви трави, настойки та екстрактів за вмістом саме цієї групи БАР. З огляду на проведені дослідження, запропоновано додатково проводити ідентифікацію та кількісне визначення іридоїдів спектрофотометричним методом у перерахунку на гарпагіду ацетат. Вміст іридоїдів у собачої кропиві траві повинен бути не менше 0,4 %. Вміст іридоїдів у собачої кропиві настойці повинен бути не менше 0,04 %.

3. Розроблено способи одержання модифікованих сухих екстрактів собачої кропиви з використанням 12 амінокислот: лізину, аспарагінової та глютамінової кислот, лейцину, аланіну, фенілаланіну, гліцину, валіну, гістидину, аргініну, цистеїну та метіоніну.

4. У спиртовому рідкому та сухому екстрактах собачої кропиви трави, одержаних з урахуванням попередніх технологічних досліджень, методом ВЕРХ виявлено 10 сполук фенольної природи, зокрема похідні гідроксикоричних кислот і флавоноїди. Визначено кількісний вміст цих сполук. У рідкому екстракті собачої кропиви звичайної виявлено 73 леткі сполуки, з яких ідентифіковано 35. Загальний кількісний вміст леткої фракції становить 798,25 мг/л, зокрема: монотерпеноїдів 57,9 мг/л, сесквітерпеноїдів 34,8 мг/л, дитерпенів 27,2 мг/л, коротколанцюгових вуглеводнів і аліфатичних спиртів 7,7 мг/л, аліфатичних довголанцюгових кислот і їх естерів 85 мг/л та фітостеролів 63,9 мг/л. Домінувальними сполуками серед речовин терпеноїдної природи є: фітол, борнілацетат, тимол, камфен, α -пінен, *n*-цимен, каріофілен та каріофіленоксид. У результаті ТШХ аналізу одержаних сухих модифікованих екстрактів ідентифіковано такі групи БАР: флавоноїди (рутин та гіперозид), похідні гідроксикоричних кислот (хлорогенова та кофейна кислоти), іридоїдні сполуки (гарпагід, гарпагіду ацетат та аюгозид). В екстрактах методом ВЕРХ було виявлено 15 основних речовин фенольної природи. У сухих модифікованих екстрактах спектрофотометричним методом було визначено кількісний вміст суми флавоноїдів, іридоїдів та поліфенолів. Результати фітохімічного аналізу сухих модифікованих екстрактів засвідчили, що склад фенольних сполук суттєво не відрізняється, а основні відмінності пов'язані з амінокислотами, які, напевно, і мають вплив на загальний психотропний ефект.

5. Дослідження впливу сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви на поведінкові реакції в тестах «відкритого поля» та «піднесеного хрестоподібного лабіринту» довели, що найбільш ефективними субстанціями з анксиолітичною дією є екстракти, модифіковані на основі введення до них окремих амінокислот: лізину, гліцину, аланіну, валіну, фенілаланіну та аргініну. Поряд з цим екстракт з фенілаланіном виявив виражену діуретичну активність.

6. Розроблено проекти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження 6 сухих модифікованих екстрактів собачої кропиви трави, які було модифіковано з лізином, гліцином, аланіном, валіном, фенілаланіном та аргініном. Проекти МКЯ на ці екстракти розроблено за такими показниками: опис, розчинність, ідентифікація (ТШХ: метод А (флавоноїди), В (іридоїди) та С (амінокислота), втрата в масі під час висушування (не більше 10 %), залишкові кількості органічних розчинників (спирт етиловий не більше 1,0 %), важкі метали (не більше 100 ppm), мікробіологічна чистота, вміст флавоноїдів (не менше 2 % у перерахунку на гіперозид) та іридоїдів (не менше 0,4 % у перерахунку на гарпагіду ацетат).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Комісаренко А. М., Штриголь С Ю. Фітохімічне вивчення рідкого екстракту трави кропиви собачої та дослідження його психотропної активності. *Збірник наукових праць*

співробітників НМАПО імені П.Л. Шупика. 2015. Вип. 24. № 5. С. 212-217. (Дисертантом самостійно проведено огляд літературних джерел, узагальнено отримані результати досліджень та оформлено статтю до друку).

2. Романенко Е. А. Исследование летучей фракции спиртового жидкого экстракта травы пустырника. *Вестник Пермской государственной фармацевтической академии*. 2015. № 15. С. 230-231.

3. Romanenko Ye. A., Koshovyi O. M., Komissarenko A. M., Golembiovskaya O. I., Gladyshev Yu. I. The study of the chemical composition of the components of the motherwort herb. *News of Pharmacy*. 2018. № 3 (95). P. 34-38. (Дисертантом самостійно проведено огляд літературних джерел, виконано експериментальну частину, узагальнено отримані результати досліджень та оформлено статтю до друку).

4. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Ковальова А. М., Ільїна Т. В., Комісаренко А. М. Дослідження динаміки екстракції біологічно активних речовин трави собачої кропиви з метою одержання настойки. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018 № 3 (56). С. 66-71. (Дисертантом самостійно проведено огляд літературних джерел, виконано експериментальну частину, узагальнено отримані результати досліджень та оформлено статтю до друку).

5. Koshovyi O., Romanenko Ye., Komissarenko A. The study of the phenolic composition of the dry extract of motherwort herb and its psychotropic activity. *American Journal of Science and Technologies*. 2016. № 1 (21). P. 1055-1059. (Дисертантом самостійно проведено огляд літературних джерел, виконано експериментальну частину та оформлено статтю до друку).

6. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Трищук Н. М., Ільїна Т. В., Бородіна Н. В. Дослідження взаємозв'язків між вмістом основних груп БАР у настійці собачої кропиви (*Leonurus cardiaca*) трави та її психотропною активністю. *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 4 (57). С. 69-74. (Дисертант брав участь у проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

7. Romanenko Ye., Koshovyi O., Plyina T., Borodina N., Melnyk N. Standardization parameters of modified extracts from *Leonurus cardiaca* herb. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. №1 (17). P. 17-23. (Дисертантом самостійно проведено огляд літературних джерел, виконано експериментальну частину та оформлено статтю до друку).

8. Романенко Є. А., Трищук Н. М., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Бородіна Н. В., Ковальова А. М., Ільїна Т. В. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин трави собачої кропиви з аланіном з седативною та діуретичною дією: пат. на кор. мод. 139940 Україна. № u 201908253; заявл. 15.07.2019; опубл. 27.01.2020, Бюл. № 2. (Дисертантом самостійно проведено літературний аналіз і патентний пошук за обраною тематикою, виконано експериментальну частину, підготовлено заявку до подання в Укрпатент).

9. Романенко Є. А., Трищук Н. М., Кошовий О. М., Штриголь С. Ю., Кіреєв І. В., Дейко Р. Д., Комісаренко А. М. Спосіб одержання комплексу БАР трави собачої кропиви з аргініном з седативною та стреспротекторною

дією: пат. на кор. мод. 140280 Україна. № у 201908230; заявл. 15.07.2019; опубл. 10.02.2020, Бюл. № 3. (Дисертант брав участь у патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

10. Романенко Є. А., Трищук Н. М., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Бородіна Н. В., Ковальова А. М. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин трави собачої кропиви з гліцином з седативною дією: пат. на кор. мод. 140688 Україна. № у 201908220; заявл. 15.07.2019; опубл. 10.03.2020, Бюл. № 5. (Дисертантом самостійно проведено літературний аналіз і патентний пошук за обраною тематикою, виконано експериментальну частину, підготовлено заявку до подання в Укрпатент).

11. Романенко Є. А., Трищук Н. М., Кошовий О. М., Кіреєв І. В., Ільїна Т. В., Комісаренко А. М. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин трави собачої кропиви з фенілаланіном з седативною та діуретичною дією: пат. на кор. мод. 140278 Україна. № у 201908227; заявл. 15.07.2019; опубл. 10.02.2020, Бюл. № 3. (Дисертантом самостійно проведено літературний аналіз і патентний пошук за обраною тематикою, виконано експериментальну частину, підготовлено заявку до подання в Укрпатент).

12. Фенольний склад трави кропиви собачої / Є. А. Романенко, О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко // Матеріали Української науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з дня народження доктора хімічних наук, професора Павла Олексійовича Петюніна (24-25 квітня 2014 р.). – Х. : НФаУ, 2014. – С. 118.

13. Романенко Е. А., Кошевой О. Н., Ковалева А. М., Комисаренко А. Н. Исследование эфирного состава спиртового экстракта травы пустырника. *Человек и лекарство* : мат. XXII Рос. нац. конгресс, г. Москва, 6-10 апреля 2015 г. Москва. 2015. С. 251.

14. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Комісаренко А. М. Дослідження фенольного складу та психотропної активності сухого екстракту трави кропиви собачої. *VIII Національний з'їзд фармацевтів* : мат. з'їзду, м. Харків, 13-16 вересня 2016 р. Харків. 2016. Т.1. С. 133.

15. Романенко Е. А., Кошевой О. Н., Комисаренко А. Н. Исследование фенольных соединений спиртового экстракта травы пустырника. *Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты* : мат. IX Междунар. симпозиума, г. Москва, 20-25 апреля 2015 г. Москва, 2015. С. 638-639.

16. Svets I. O., Kolomiets O. V., Romanenko E. A. Research of the motherwort herb components and their tinctures. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students, Kharkiv, April 20, 2017. Kharkiv. 2017. Vol. 1. P. 129.

17. Романенко Є. А., Трищук Н. М., Кіреєв І. В., Комісаренко А. М. Вивчення хімічного складу та психотропної активності сухого екстракту трави кропиви собачої. *Ліки – людині* : Мат. I Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 30-31 березня 2017 р. Харків. 2017. Т. 2. С. 274.

18. Romanenko Ye., Koshovyi O., Ilina T., Borodina N., Kireyev I.,

Tryshchuk N. The study of a new dry extract of the motherwort herb. *Science and practice 2018* : abstracts of 9th International Pharmaceutical Conference. Lithuania, Kaunas, November 9, 2018. Kaunas, 2018. P. 38.

19. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Голембіовська О. І. Дослідження фенольного складу настоек собачої кропиви. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : мат. VII Наук.-практ. конференції з міжнародною участю, м. Тернопіль, 27-28 вересня 2018 р. Тернопіль. 2018. С. 37-38.

20. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Ільїна Т. В., Трищук Н. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення з трави собачої кропиви та гліцину лікувально-профілактичного засобу з седативною дією. *Сучасна фармація: історія, реальність та перспективи розвитку* : мат. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю, м. Харків, 19 вересня 2019 р. Харків. 2019. Т. 1. С. 296-297.

21. Романенко Є. А., Кошовий О. М., Трищук Н. М., Кіреєв І. В. Перспективи створення лікувально-профілактичного засобу на основі модифікованого екстракту з трави собачої кропиви з фенілаланіном. *Сучасні напрямки удосконалення фармацевтичного забезпечення населення: від розробки до використання лікарських засобів природного і синтетичного походження* : мат. Наук.-практ. конф. з міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, Яремче, 12-13 травня 2020 р. Івано-Франківськ. 2020. С. 177-178.

Романенко Є. А. Фітохімічне вивчення екстрактів собачої кропиви для створення нових лікарських засобів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія і фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

Дисертаційну роботу присвячено комплексному фітохімічному вивченню модифікованих сухих екстрактів собачої кропиви звичайної та вихідної сировини (трави, настойки) для створення нових потенційних стандартизованих лікарських засобів з психотропною, анксиолітичною та діуретичною активністю. Розроблено способи одержання модифікованих сухих екстрактів на основі собачої кропиви настойки з використанням 12 амінокислот (лізин, аспарагінова та глутамінова кислоти, лейцин, аланін, фенілаланін, гліцин, валін, гістидин, аргінін, цистеїн та метіонін). В одержаних сухих модифікованих екстрактах виявлено 15 основних речовин фенольної природи, 8 з яких було ідентифіковано та визначено їх кількісний вміст: 10 фенолкарбонових та гідроксикоричних кислот, 3 з яких ідентифіковано (хлорогенова, кофейна та розмаринова кислоти). Серед флавоноїдів ідентифіковано катехін, гіперозид та рутин. В екстрактах визначено значний вміст елагової, кофейної та хлорогенової кислот. Дослідження впливу екстрактів собачої кропиви на поведінкові реакції засвідчили, що найбільш ефективними субстанціями з анксиолітичною дією є

екстракти, модифіковані з лізином, гліцином, аланіном, валіном, фенілаланіном та аргініном. Екстракт з фенілаланіном виявив виражену діуретичну активність. Розроблено проекти МКЯ та згідно з їх вимогами проведено дослідження сухих модифікованих екстрактів з собачої кропиви трави.

Романенко Е. А. Фитохимическое изучения экстрактов пустырника для создания новых лекарственных средств. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет, Минздрав Украины, Харьков, 2020.

Диссертация посвящена комплексному фитохимическому изучению модифицированных сухих экстрактов пустырника и исходного сырья (травы, настойки) для создания новых потенциальных стандартизированных лекарственных средств с психотропной активностью. Разработаны способы получения модифицированных сухих экстрактов на основе пустырника настойки с использованием 12 аминокислот (лизин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, лейцин, аланин, фенилаланин, глицин, валин, гистидин, аргинин, цистеин и метионин). В полученных экстрактах обнаружено 15 основных веществ фенольной природы, 8 из которых были идентифицированы, и установлено их количественное содержание: 10 фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот, 3 из которых идентифицированы (хлорогеновая, кофейная и розмариновая кислоты). Среди флавоноидов идентифицированы катехин, гиперозид и рутин. В экстрактах выявлено значительное содержание эллаговой, кофейной и хлорогеновой кислот. Исследование влияния экстрактов пустырника на поведенческие реакции показали, что наиболее эффективными веществами с анксиолитическим действием оказались экстракты, модифицированные с лизином, глицерином, аланином, валерином, фенилаланином и аргинином. Экстракт с фенилаланином показал выраженную диуретическую активность. Разработаны проекты МКЯ и в соответствии с их требованиями проведены исследования сухих экстрактов из травы пустырника.

Romanenko E.A. Phytochemical study of *Leonurus cardiaca* extracts for creating new medicines. - A qualification research work on the rights of a manuscript.

The dissertation for a Candidate of pharmaceutical sciences degree (PhD) in speciality 15.00.02, “Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy”, National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2020.

The dissertation presents a complex phytochemical study of the modified

dry *Leonurus cardiaca* extracts and raw materials (herbs, tinctures) for creating new potential standardized medicines with psychotropic activity.

As a result of phytochemical analysis of BAS by HPLC tinctures of herb, leaves, flowers and stems of *Leonurus cardiaca*, 6 substances were identified: 3 flavonoids (rutin, apigenin and catechin), 3 hydroxycinnamic acids (chlorogenic, rosemary and caffeic acids), and their quantitative contents were established. It was found that flowers accumulate more hydroxycinnamic acids, the main component of which is chlorogenic acid, while a significant amount of flavonoids accumulate in the leaves. When studying the dynamics of extraction of phenolic compounds from *Leonurus cardiaca* herb on the basis of mathematical processing of the obtained data, the effective parameter of extraction frequency (2 times) was determined. It was found that the greatest sedative activity showed substances that contain a significant amount of iridoids, which indicates the feasibility of additional standardization of *Leonurus cardiaca* herb, tinctures and its extracts on the content of this group of BAS. The quantitative determination of the iridoid content was proposed to perform by the spectrophotometric method calculated with reference to harpagide acetate. The content of iridoids in the motherwort herb should be at least 0.4 %. The content of iridoids in the motherwort tincture should be at least 0.04 %.

As a result of studying compounds of terpenoid nature in the liquid extract of motherwort 73 volatile compounds were found, 35 of them (monocyclic and bicyclic monoterpenoids, sesquiterpenoids, etc.) were identified. Among them there were 13 monoterpenoids, 10 sesquiterpenoids, diterpene and aliphatic alcohols, long-chain aliphatic acids and their esters and phytosterols. The dominant compounds among substances of terpenoid nature were phytol, bornyl acetate, thymol, camphene, α -pinene, p-cymene, caryophyllene, caryophyllene oxide.

Methods for obtaining modified dry extracts based on *Leonurus cardiaca* tincture using 12 amino acids (lysine, aspartic and glutamic acid, leucine, alanine, phenylalanine, glycine, valine, histidine, arginine, cysteine and methionine) have been developed.

As a result of TLC analysis of the obtained dry modified extracts, the following groups of BAS were identified: flavonoids (rutin and hyperoside), derivatives of hydroxycinnamic acids (chlorogenic and caffeic acids), iridoid compounds (harpagide, harpagide acetate and ayugozid). HPLC extracts revealed 15 main substances of phenolic nature, 8 of which were identified: 10 phenolic and hydroxycinnamic acids, 3 of which were identified (chlorogenic, caffeic and rosemary acids). Among flavonoids, catechin, hyperoside and rutin have been identified. Significant content of ellagic, caffeic and chlorogenic acids was determined in the extracts. Methoxyapigenin, ellagic acid and catechin found in there search do not mentioned in motherwort before. Quantitative content of the sum of flavonoids, iridoids and polyphenols was determined in the extracts by

spectrophotometric method. Based on the results of phytochemical analysis of the extracts, it can be concluded that the composition of phenolic compounds does not differ significantly, and the main differences are related to amino acids, which probably have an effect on the overall psychotropic effect.

Studies of the effect of *Leonurus cardiaca* extracts on behavioural responses in the «open field» and «elevated cruciform labyrinth» tests have shown that the most effective substances as antidepressants are extracts modified by the introduction of amino acids: lysine, glycine, alanine, alanine and valine. Thus, the motherwort extracts in the complexes with valine, glycine and arginine were the most active; they led to an increase in the motor and exploratory activity of the experimental rats, while reducing the indicators of the animals' emotional state. The anti-anxiety effect of compositions of the motherwort extracts with arginine, histidine, glycine, and valine appeared to be the most expressive. The results obtained indicate the presence of the motherwort extracts studied in the complex with amino acids of the anxiolytic activity. The extracts with glycine, valine and arginine were more effective in reducing anxiety in animals. The advantages of the extracts studied are the absence of action on the muscle tone and coordination of movements. In addition, the extract with phenylalanine showed pronounced diuretic activity.

DMF projects have been developed. The DMF projects for the motherwort dry extracts were developed according to the following indicators: description, solubility, identification (TLC: method A (flavonoids), B (iridoids) and C (amino acid), loss on drying (not more than 10 %), residual amounts of organic solvents (ethyl alcohol – not more than 1.0 %), heavy metals (not more than 100 ppm), microbiological purity, the flavonoid content (not less than 2 % calculated with reference to hyperoside) and iridoids (not less than 0.5 % calculated with reference to harpagide acetate). The study of the dry extracts of *Leonurus cardiaca* herb have been carried out in accordance with their requirements. All of them corresponded to the developed parameters.

Перелік умовних позначень

- БАР – біологічно активні речовини;
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;
- ДФУ – Державна фармакопея України;
- МОЗ – Міністерство Охорони Здоров'я;
- ЛРС – лікарська рослинна сировина;
- МКЯ – методики контролю якості;
- ПХ – паперова хроматографія;
- СФ – спектрофотометрія;
- ТШХ – тонкошарова хроматографія;
- УФ-спектр – ультрафіолетовий спектр;
- ЦНС – центральна нервова система.